Aus dem Hygiene-Institut in Marburg
Direktor Professor Dr. med. Rudolf Siegert

Biochemische Leistungen von nichtproliferierenden Sproßpilzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Elisabeth Pöppel, geb. Lauer
aus Köln

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut in Marburg
Direktor Professor Dr. med. Rudolf Siegert

Biochemische Leistungen von nichtproliferierenden Sproßpilzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Elisabeth Pöppel, geb. Lauer
aus Köln

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am: 3.2.1967

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr.med.Dr.med.dent. H.Heuser

Referent: Professor Dr.med. R.Siegert

Correferent: Dozent Dr.W.Bommer

A. Einleitung

Die Pilzdifferenzierung erfolgt nach morphologischen, kul= turellen, biochemischen und serologischen Kriterien. Sie läßt allerdings noch viele Wünsche offen, weil unsere Kenntnisse über die Antigenstruktur und die biochemischen Leistungen der Pilze sehr lückenhaft sind.(1)

Besonders vordringlich ist die Aufklärung ihres biochemi= schen Verhaltens, nicht nur hinsichtlich der Klassifizierung und Diagnostik, sondern auch zur Ermittlung der optimalen Le= bensbedingungen. Hieraus könnte erheblicher praktischer Nutzen vor allem für die Pilzzüchtung, Chemotherapie und technische Mykologie gezogen werden.

Bisher beschränkt sich die biochemische Differenzierung auf die Prüfung von Assimilation und Fermentation an prolife= rierenden Kulturen. Als Substrate verwendet man verschiedene Zucker, z.B. Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Saccharose und Rhamnose, sowie Stickstoffverbindungen, z.B. Ammoniumsul= fat, Asparagin, Harnstoff und Pepton. Kriterien der enzymati= schen Substratspaltung sind Gasbildung, Wachstum und pH-Ände= rungen, die durch geeignete Indikatoren angezeigt werden. Die Nachteile dieses Verfahrens bestehen darin, daß in komplexen Medien gearbeitet werden muß und die darin ablaufenden Stoff= wechselvorgänge keinen Rückschluß auf den Reaktionsablauf er= lauben. Außerdem wird die Zahl der Reaktionen dadurch einge= schränkt, daß komplexe Medien den direkten Nachweis vieler Stoffwechselprodukte stören. Ferner können nicht alle Chemi= kalien, die zum Nachweis von Stoffwechselprodukten nötig

wären, wegen ihrer Toxizität dem Kulturmedium zugesetzt wer= den.

Um diese Nachteile zu vermeiden, haben verschiedene Auto= ren[2-17] versucht, die enzymatischen Leistungen nicht mehr an proliferierenden Kulturen in komplexen Nährmedien zu prüfen, sondern zu ruhenden Kulturen in gepufferten Lösungen überzuge= hen, die nur das zu testende Substrat enthalten. Die unter die= sen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse waren reproduzierbar.

Von den in der mikrobiologischen Diagnostik gebräuchlichen Reaktionen erlauben nur wenige einen sicheren Rückschluß auf den Reaktionsablauf. Dies trifft zu für die Nitratreduktion, die NH_3-Bildung aus Harnstoff und die H_2S-Bildung aus Cystein. Demgegenüber ermöglichen Reaktionen, bei denen beispielsweise Gasbildung aus Zuckern erfolgt oder aus einem Indikatorumschlag auf Säurebildung geschlossen wird, keinen Rückschluß auf den zugrundeliegenden Stoffwechseltyp. Diese in der Routinediagno= stik gebräuchlichen Verfahren sind somit vieldeutig und deshalb ungeeignet, um Klarheit über die speziellen biochemischen Lei= stungen der Pilze zu erhalten.

Aus diesen Gründen hat BÜRGER[13-15] versucht, neben den bisher üblichen biochemischen Reaktionen neue Testmethoden zur Differenzierung nichtproliferierender Keime zu entwickeln. Sie betreffen vorwiegend den Nachweis von Hydrolasen und erlauben einen sichern Rückschluß auf den Reaktionsablauf.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es festzustellen, inwieweit die bei nichtproliferierenden Keimen gefundenen Er= gebnisse mit den nach herkömmlichen Methoden gewonnenen Resul= taten übereinstimmen und eine Differenzierung der Pilze ermög= lichen.

Als Testkeime dienten verschiedene Hefestämme vorwiegend der Gattung Candida. Wir wählten für unsere Versuche hauptsächlich Candidaarten, weil sie, häufigste Erreger von Mykosen, die größte Rolle in der Pilzdiagnostik spielen. Außerdem treten gerade bei der biochemischen Differenzierung der Candidaarten mancherlei Schwierigkeiten auf, die auf der weitgehenden Übereinstimmung ihrer Stoffwechselleistungen beruhen.[18-31]

B. Material und Methoden

I. Testkeime

Die Untersuchungen betrafen 49 Stämme von 20 Pilzarten, die in Tab.1 mit ihren Herkunftsbezeichnungen und Sammlungs= nummern aufgeführt sind. Die Keime stammen aus dem Centralbureau für Schimmelkulturen in Delft, aus dem Mykologischen Labo= ratorium des Hygiene-Instituts und der Dermatologischen Klinik der Universität Marburg. Den Herren Professoren SEELIGER Würz= burg und WINDISCH Berlin danken wir für die freundliche Über= lassung weiterer Stämme.

II. Züchtung

Von den auf Sabouraud-Maltose-Schrägagar bei Zimmertempe= ratur 2-3 Tage lang angezüchteten Pilzen wurden je 2 volle Platinösen in Erlenmeyerkölbchen, die 25 ml Nährlösung enthiel= ten, überimpft. Die Nährlösung setzte sich in Anlehnung an eine von CZAPEK-DOX gegebene Vorschrift[32] folgendermaßen zu= sammen: 30 g Maltose, 2 g Dextrose, 10 g Hefeextrakt gepulvert+, 10 g Pepton aus Casein (tryptisch verdaut+), 1 g KH_2PO_4, 3 g $NaNO_3$, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g KCl und 0,1 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, gelöst in 1000 ml Wasser.

Die Kölbchen wurden 2 Stunden bei Zimmertemperatur ge= schüttelt und anschließend 60 Stunden bei 37°C im Brutschrank gehalten. Die Ernte der Keime erfolgte durch Abzentrifugieren (10 min., 18000 g) und anschließendes zweimaliges Waschen mit 0,9%iger Kochsalzlösung.

(+ Fa.Merck, Darmstadt)

Tab. 1

	Keimart	Bezeichnung der Stämme
1.)	Candida albicans Holland	CBS 256
2.)	Candida albicans London A	3153
3.)	Candida albicans London B	3156
4.)	Candida albicans	151608
5.)	Candida albicans	158519
6.)	Candida albicans	159232
7.)	Candida albicans	156581
8.)	Candida albicans	156583
9.)	Candida albicans	162863
10.)	Candica albicans	18438
11.)	Candida albicans	149462
12.)	Candida albicans	20324
13.)	Candida albicans	115720
14.)	Candida tropicalis	CBS 94
15.)	Candida albicans	104967
16.)	Candida albicans	106365
17.)	Candida albicans	110061
18.)	Candida albicans	89582
19.)	Candida albicans	62848
20.)	Candida tropicalis	151607
21.)	Candida tropicalis	16431
22.)	Candida tropicalis	63737
23.)	Candida pseudotropicalis	132391
24.)	Candida pseudotropicalis	139014
25.)	Candida pseudotropicalis	143793
26.)	Candida pseudotropicalis	145353
27.)	Candida pseudotropicalis	157981
28.)	Candida pseudotropicalis	CBS Windisch
29.)	Candida pseudotropicalis	IS Gr C8
30.)	Candida pulcherrima	Müller
31.)	Candida pulcherrima	148520
32.)	Candida pulcherrima	144198
33.)	Candida pulcherrima	136759
34.)	Candida robusta	CBS 2270
35.)	Candida stellatoidea	CBS 1905
36.)	Candida utilis	CBS 567
37.)	Candida parapsilosis	Hautklinik Marburg
38.)	Candida reukauffii	Müller
39.)	Candida guilliermondii	CBS 566
40.)	Candida krusei	CBS 573
41.)	Candida humicula synonyma curvata	CBS Windisch
42.)	Cryptococcus neoformans	Seeliger
43.)	Rhodutorula mucilaginosa	Hautklinik Marburg
44.)	Saccharomyces cerevisiae	1172
45.)	Saccharomyces rouxii	CBS 732
46.)	Torulopsis Dattila	Hautklinik Marburg
47.)	Torulopsis famata	535
48.)	Torulopsis glabrata	5311
49.)	Trichosporon cutaneum	5170 Seeliger

Die Keimdichte der Suspension wurde mit 0,9%iger Kochsalz=lösung nephelometrisch mit einem Eppendorfphotometer bei 578 mμ auf 4-8 mg Trockengewicht/ml eingestellt.

Alle Pilzsuspensionen wurden vor Verwendung auf Freiheit von bakteriellen Verunreinigungen geprüft. Die Kontrollen er=folgten auf festen Nährböden unter aeroben Bedingungen.

III. Durchführung der Versuche

Die Prüfung der biochemischen Leistungen wurde nach dem von BÜRGER[13-15] angegebenen Verfahren ausgeführt. Hiernach werden 0,3 ml einer nichtproliferierenden Keimsuspension mit dem gleichen Volumen einer gepufferten Substratlösung zusammen=gegeben und bei 37°C mindestens 6 Stunden inkubiert. Diese Substrat-Puffermischung wird von Nachweisreagenzien getrennt in verschiedenen Kammern auf einer Platte untergebracht. Die Kammern bestehen aus kaskadenförmig angeordneten Unterabschnit=ten. Sie sind gasdicht durch einen Glasdeckel mit Dichtung verschließbar und voneinander abgetrennt. Zur Ausführung jeder einzelnen Reaktion benötigt man eine Kammer. In einen der Un=terabschnitte werden das Substrat- und Bakteriengemisch, in die anderen die Nachweisreagenzien gegeben. Nach Beendigung der Reaktionszeit wird die Platte um 45° gegen die Horizontale geneigt. Dabei fließt die Substrat-Bakterienmischung mit den Reagenzien zusammen. Anschließend wird das Reaktionsergebnis nach verschiedener Einwirkungszeit abgelesen.

Will man eine Gasbildung aus Kohlenhydraten nachweisen, so verfährt man wie folgt: Ein mit Substrat und Bakteriensus=pension gefüllter Unterabschnitt wird nach oben hin mit einem

Glasdeckel verschlossen. Das bei der Fermentation entwickelte Gas sammelt sich unter ihm, während gleichzeitig die durch die Gasblasen verdrängte Flüssigkeit in den nächsten Kammerab= schnitt übertreten kann.

Eine Übersicht über die verwendeten Substrate, die Reak= tionsbedingungen und die einzelnen, bisher nachgewiesenen Spalt= produkte ist in Tab.2 zusammengestellt.

Zu Kontrollzwecken wurden stets 2 Parallelversuche mit zusätzlichem Leerwert durchgeführt. Stimmten beide Kontroll= werte nicht überein, wurde der Versuch wiederholt.

Vor dem Reagenzienzusatz wurde am Versuchsende an minde= stens 10 Stichproben die Reinheit auf Blutagar-Platten über= prüft.

Die Versuche wurden größtenteils in Röhrchen durchgeführt, da nicht genügend Platten zur Verfügung standen. Nur zur Beob= achtung von Gasbildung, wie CO_2-Entwicklung aus Natriumformiat, D-Glucose, D(+)Galactose, D(+)Saccharose, Maltose und D(+)Lac= tose, H_2S-Bildung aus Cystein und NH_3-Bildung aus Harnstoff wurde die Platte benutzt.

IV. Versuchsdauer

Die Versuche wurden in der Regel nach maximal 6 Stunden abgebrochen. In einzelnen Fällen wurden Ansätze bis zu 20 Stun= den weiter beobachtet. Bei denjenigen Substraten, deren Spaltung durch Farbänderung ohne Reagenzienzusatz erkennbar war, erfolg= te die Kontrolle der Ansätze in etwa halbstündigen Intervallen. In den anderen Fällen, bei denen ein Reagenzienzusatz zum Nach= weis einer Substratspaltung notwendig war, wurde erstmalig

nach 4 Stunden kontrolliert. Bei negativem Ergebnis erfolgte eine erneute Kontrolle nach 6 Stunden.

V. Auswertung der Ergebnisse

Die Zahl der durchgeführten Reaktionen betrug 16 500. Da sich die Versuchsergebnisse in dieser Form nicht überblicken ließen, wurden sie auf doppelreihige Randlochkarten übertragen. Um eine übersichtliche Darstellung zu erreichen, erfolgte eine Einteilung der Reaktionen in folgende Gruppen: Nitratreduktion, Reaktionen mit Gasbildung, die Stoffklassen: Kohlenhydrate, Alkohole, Glycoside, Carbonsäuren, Aminosäuren, die Substrate der Esterasen und Lipasen, der sauren und alkalischen Phosphatasen, der Arylsulfatasen und Peptidasen. Es ließen sich sämtliche Reaktionen eines Pilzes auf 3 Karten darstellen.

Jeder Pilzstamm erhielt eine Kennziffer.

Aus diesen Lochkarten läßt sich sofort ermitteln, welche Reaktionen durchgeführt wurden, wie oft sie positiv oder negativ ausfielen und welche von ihnen bei verschiedenen Pilzen gemeinsam auftraten.

Tab. 2

Substratlösungen:		Nachweisreaktionen:
Kohlenhydrate:		
L(+)Arabinose	($2x10^{-1}$m),	Säurebildung bewirkt Indikatorumschlag von blau nach gelb
D-Ribose	($2x10^{-1}$m),	
D(+)Xylose	($2x10^{-1}$m),	
D(-)Fructose	($1,67x10^{-1}$m),	
D(+)Galactose	($1,67x10^{-1}$m),	
D-Glucose	($1,67x10^{-1}$m),	
D-Mannose	($1,67x10^{-1}$m),	
L(+)Rhamnose	($1,83x10^{-1}$m),	
L-Sorbose	($1,67x10^{-1}$m),	
D(+)Lactose	($8,7x10^{-2}$m),	
Maltose	($8,7x10^{-2}$m),	
D(+)Saccharose	($8,7x10^{-2}$m),	
d-(+)Trehalose	($8,7x10^{-2}$m),	
Raffinose	($6x10^{-2}$m),	
in m/300 P-p, pH 7,4 mit Bromthymolblauzusatz		
Alkohole:		
Glycerin	($1,1x10^{-1}$m),	Säurebildung bewirkt Farbumschlag von blau nach gelb
Adonit	($1,97x10^{-1}$m),	
Dulcit	($1,65x10^{-1}$m),	
meso-Inosit	($1,67x10^{-1}$m),	
D(-)Mannit	($1,65x10^{-1}$m),	
D(-)Sorbit	($1,65x10^{-1}$m),	
in m/300 P-p, pH 7,4 mit Bromthymolblauzusatz		
Carbonsäuren:		
Natriumformiat	($1,5x10^{-1}$m),	Bei Alkalisierung Indikatorumschlag von gelb nach blau
Natriumcitrat	($5,1x10^{-3}$m),	
Natriummalonat	($1,2x10^{-2}$m),	
Natriummucat	($6,2x10^{-3}$m),	

Substratlösungen:		Nachweisreaktionen:
Natrium-d(-)-tartrat	($6{,}5 \times 10^{-3}$ m), in P-p mit NaOH auf pH 5,6 eingestellt mit Bromthymolblauzusatz als Indikator	Bei Alkalisierung Indikatorumschlag von gelb nach blau
Gasbildung aus:		
Natriumformiat	($5{,}9 \times 10^{-1}$ m), in m/150 P-p, pH 6,0	Gasblasen
D-Glucose	($1{,}67 \times 10^{-1}$ m),	Gasblasen
D(+)Galactose	($1{,}67 \times 10^{-1}$ m),	
D(+)Saccharose	($8{,}7 \times 10^{-2}$ m),	
Maltose	($8{,}7 \times 10^{-2}$ m),	
D(+)Lactose	($8{,}7 \times 10^{-2}$ m), in m/300 P-p, pH 7,4	
Harnstoff	($1{,}67 \times 10^{-1}$ m), in m/15 P-p, pH 7,2	Ammoniak bewirkt Farbumschlag des Indikators Phenolrot von gelb nach rot
L(+)Cystein	($4{,}95 \times 10^{-1}$ m), in wäßriger Lösung mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt	H_2S bewirkt Schwärzung durch PbS-Bildung
Aminosäuren (Decarboxylasereaktion):		
L-Arginin	($1{,}15 \times 10^{-1}$ m),	Alkalisierung bewirkt Farbumschlag des Indikatorgemisches (Bromkresolpurpur und Kresolrot) von gelb nach rotviolett
L-Lysin	($1{,}38 \times 10^{-1}$ m),	
L-Ornithin	($1{,}52 \times 10^{-1}$ m), in wäßriger Lösung auf pH 6,0 eingestellt	
L-Phenylalanin	bei 40°C gesättigte wäßrige Lösung mit n/10 NaOH auf pH 7,2 eingestellt	Phenylbrenztraubensäure gibt mit Fe-III-Salzen grüngefärbte Komplexe
D,L-Tryptophan	bei 40°C gesättigte wäßrige Lösung mit n/10 NaOH auf pH 7,2 eingestellt	a) Indolbrenztraubensäure gibt mit Fe-III-salzen einen rotgefärbten Komplex b) Indolnachweis durch Kondensation mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (Rotfärbung)

Substratlösungen:	Nachweisreaktionen:
Kaliumnitrat ($1x10^{-1}$m) mit n/100 NaOH auf pH 7,2 eingestellt	Nitrit färbt sich mit Sulfanilsäure und a-Naphthylamin rot
Glycoside:	
Aesculin	Säurebildung bewirkt
a) halbgesättigte wäßrige Lösung in m/300 P-p, pH 7,4 mit Bromthymol=blauzusatz	Indikatorumschlag von blau nach gelb
b) halbgesättigte wäßrige Lösung in 0,5m P-p, pH 7,4	6,7-Dihydroxycumarin gibt mit Ferricitrat eine Braunfärbung
p-Arbutin ($2,2x10^{-1}$m)	Säurebildung bewirkt
a) in m/300 P-p, pH 7,4 mit Bromthymolblauzusatz	Indikatorumschlag von blau nach gelb
b) in 0,5m P-p, pH 7,4	Phloroglucin gibt mit Hydrochinon eine Rot=färbung
D-Salicin	
bei 40°C gesättigte wäßrige Lösung	
a) in m/300 P-p, pH 7,4 mit Bromthymolblauzusatz	Säurebildung bewirkt Indikatorumschlag von blau nach gelb
b) in 0,5m P-p, pH 7,4	o-Hydroxybenzylalkohol bildet mit 4-Aminoanti=pyrin eine rotgefärbte, mit 2,6-Dibromchinon-4-chlorimid eine blauge=färbte Verbindung
6-Brom-2-naph= thyl-ß-D-galactopyranosid ($7,8x10^{-4}$m), in 0,5m P-P, pH 7,0	ß-Naphthol kuppelt mit diazotiertem o-Dianisi=din zu einem rot-brau=nen Farbstoff
	4-Aminoantipyrin gibt mit ß-Naphthol eine Grünfärbung
o-Nitrophenyl-ß-D-galactopyranosid ($1x10^{-3}$m) in T-p(J=0,1), pH 7,2	p-Nitrophenol ist in alkalischer Lösung gelb gefärbt
Indoxyl-ß-D-glucosid ($1,75x10^{-3}$m), in 0,2 m P-p, pH 8,0	Indoxyl wird durch Luft=sauerstoff in alkali=scher Lösung zu Indigo oxydiert

Substratlösungen:		Nachweisreaktionen:
Phenolphthalein-glucuronid in Acet-p, pH 5,4	($1{,}95 \times 10^{-4}$ m)	Phenolphthalein färbt sich in alkalischer Lösung rot
Substrate der Esterasen und Lipasen:		
a-Naphthylacetat	($1{,}07 \times 10^{-3}$ m),	Freiwerdendes a- bzw. ß-Naphthol wird entweder mit Naphthionsäure zu einem roten Farbstoff gekuppelt oder durch Farbreaktion mit 4-Aminoantipyrin(a-Naphthol ergibt Rotfärbung, ß-Naphthol Blau-Grün-Färbung) nachgewiesen
Naphthol-AS-acetat in P-p(J=0,05), pH 7,4	($6{,}6 \times 10^{-4}$ m),	
Indoxylacetat	($2{,}3 \times 10^{-3}$ m),	Indoxyl wird in alkalischer Lösung durch den Luftsauerstoff zu Indigo oxydiert
Indoxylbutyrat in 0,1m T-p, pH 8,5	($1{,}95 \times 10^{-3}$ m),	
Caprylsäure-ß-naphthylester	($1{,}83 \times 10^{-3}$ m),	4-Aminoantipyrin ergibt mit ß-Naphthol eine Blau-Grün-Färbung
Laurinsäure-ß-naphthylester suspendiert in P-p,(J=0,05) pH 7,4	($1{,}53 \times 10^{-3}$ m)	
p-Nitrophenyl-laurat	($1{,}56 \times 10^{-3}$ m),	p-Nitrophenol färbt sich in alkalischer Lösung gelb
p-Nitrophenyl-myristat suspendiert in 0,2m P-p, pH 7,4	($1{,}43 \times 10^{-3}$ m)	
Substrate der Sulfatasen:		
Indoxylsulfat in 0,1m T-p, pH 8,5	($1{,}59 \times 10^{-3}$ m)	Indoxyl wird in alkalischer Lösung durch den Luftsauerstoff zu Indigo oxydiert
p-Nitrophenyl-sulfat in Acet-p, pH 5,8	($2{,}32 \times 10^{-3}$ m),	p-Nitrophenol färbt sich in alkalischer Lösung gelb
2-Hydroxy-5-nitrophenyl-sulfat in Acet-p, pH 5,8	($2{,}31 \times 10^{-3}$ m)	In alkalischer Hydrochinonlösung ergibt 2-Hydroxy-5-nitrophenol eine Rotfärbung

Substratlösungen:		Nachweisreaktionen:
Substrate der Phosphatasen:		
di-Na-phenyl-phosphat in Carb-p, pH 9,3	($4,6 \times 10^{-3}$m),	2,6-Dibromchinon-4-chlorimid gibt mit Phenol in alkalischer Lösung eine Blaufärbung
a-Naphthyl-phosphat a)in Acet-p, pH 5,2 b)in T-p, pH 8,3	($1,22 \times 10^{-3}$m),	a-Naphthol läßt sich mit diazotiertem Naphthionat zu einem roten Farbstoff kuppeln
p-Nitrophenyl-phosphat a)in Gly-p, pH 10,5 b)in Cit-p, pH 4,8	($6,47 \times 10^{-3}$m),	p-Nitrophenol färbt sich in alkalischer Lösung gelb
Phenolphthalein-diphosphat	($1,25 \times 10^{-4}$m),	Phenolphthalein ist in alkalischer Lösung rot gefärbt
Colaminphenol-phthaleindiphosphat a)in Acet-p, pH 5,4 b)in V-p, pH 9,7	($1,39 \times 10^{-4}$m)	
Substrate der Peptidasen:		
L-Alanin-ß-naphthylamid	($2,8 \times 10^{-3}$m),	Naphthylamin läßt sich nach Diazotierung mit ß-Naphthol zu einem roten Farbstoff kuppeln
L-Leucin-ß-naphthylamid	($2,4 \times 10^{-3}$m)	
N-ε-(a-naphthyl)-D,L-glutamin in 0,2m T-p auf pH 6,5 eingestellt	($2,58 \times 10^{-3}$m)	
L-Cystin-di-ß-naphthylamid in 0,2m T-p auf pH 6,0 eingestellt	($1,63 \times 10^{-3}$m),	
N-Carbo-ß-naphthoxy-D,L-phenylalanin in T-p(J=0,001), pH 7,05	($9,25 \times 10^{-4}$m)	ß-Naphthol gibt mit 4-Aminoantipyrin eine Blau-Grünfärbung und mit 2,6-Dibromchinon-4-chlorimid eine Rot-Braunfärbung

Erläuterungen:

P-p	:	Phosphatpuffer
T-p	:	Trishydroxymethyl-aminomethan-Puffer
Acet-p	:	Acetatpuffer
Gly-p	:	Glycinpuffer
Carb-p	:	Carbonatpuffer
Cit-p	:	Citratpuffer
V-p	:	Veronalpuffer

C. Ergebnisse

I. Differenzierung der Arten

Um die untersuchten Pilze gegeneinander abzugrenzen, mußten zunächst die Reaktionen ausgesondert werden, die in allen Fällen positiv waren, und diejenigen, die stets ein negatives Ergebnis zeigten.

Folgende, in Tab.2 aufgeführten Substrate wurden von allen Pilzen (Tab.1) gespalten: L-Alanin-ß-naphthylamid, L-Leucin-ß-naphthylamid, a-Naphthylacetat und Cystein.

Niemals angegriffen wurden: L(+)Arabinose, D-Ribose, D(+)Xylose, L(+)Rhamnose, L-Sorbose, Glycerin, Adonit, Dulcit, meso-Inosit, D(-)-Mannit, D-Sorbit, Natriumcitrat, Natriummalonat, Natriummucat, Na-d(-)tartrat, p-Arbutin, Indoxylsulfat, p-Nitrophenylsulfat, 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat, Naphthol-AS-acetat, L(+)-Arginin, L(+)-Lysin, L-Ornithin, L-Phenylalanin. Aus Tryptophan wurden weder Indolbrenztraubensäure noch Indol gebildet. Gasbildung aus Natriumformiat konnte nicht nachgewiesen werden.

Alle Substrate, denen gegenüber sich die Keime unterschiedlich verhielten, sind in Tab.3 zusammengefaßt. Bei den Substraten Colaminphenolphthaleindiphosphat und Phenolphthaleindiphosphat führten unsere Testkeime zu identischen Reaktionen. Aus diesem Grund wurde in Tab.3 nur Phenolphthaleindiphosphat aufgeführt.

Stellt man alle auf Grund ihres biochemischen Verhaltens miteinander identischen Pilze zusammen, so erhält man folgende Gruppierung:

Tab 3

	Kohlenhydrate																	Glycoside							
	D(-)Fructose	D(+)Galactose	D(+)Galactose (Gase-Bildung)	D-Glucose	D(+)Glucose (Gase-Bildung)	D-Mannose	D(+)Lactose	D(+)Lactose (Gase-Bildung)	Maltose	Maltose (Gase-Bildung)	D(+)Saccharose	D(+)Saccharose (Gase-Bildung)	D(+)Trehalose	Raffinose	Na-formiat	TM	Nitrit-Bildung	Formaldehyd (Gase-Bildung)	Aesculin (Gase-Bildung)	Aesculin (Gerbstoffbildung)	Salicin (Gase-Bildung)	Salicin (Gerbstoffbildung)	Cyclo-Hexanol	Cyclo-Hexanol (Gase-Bildung)	Phenolphthalein-Glucuronid	Indoxyl-β-D-Glucosid
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1.) Candida albicans Holland	+ 40	-	-	+ 40	+ 90	+ 40	-	-	+ 120	+ 120	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.) Candida albicans London A	+ 40	-	-	+ 40	+ 90	+ 40	-	-	+ 120	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.) Candida albicans London B	+ 40	-	-	+ 40	+ 90	+ 40	-	-	+ 120	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.) Candida albicans	+ 60	-	-	+ 60	+ 120	+ 60	-	-	+ 60	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.) Candida albicans	+ 60	-	-	+ 60	+ 90	+ 60	-	-	+ 60	+ 90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.) Candida albicans	+ 60	-	-	+ 60	+ 90	+ 60	-	-	+ 60	+ 90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.) Candida albicans	+ 60	-	-	+ 60	+ 60	+ 60	-	-	+ 60	+ 60	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8.) Candida albicans	+ 60	-	-	+ 60	+ 60	+ 60	-	-	+ 60	+ 60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.) Candida albicans	+ 60	-	-	+ 60	+ 90	+ 60	-	-	+ 60	+ 90	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.) Candida albicans	+ 60	-	-	+ 60	+ 150	+ 60	-	-	+ 60	+ 150	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.) Candida albicans	+ 150	-	-	+ 30	+ 30	+ 150	-	-	+ 30	+ 30	-	-	+ 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.) Candida albicans	+ 150	-	-	+ 150	+ 150	+ 150	-	-	+ 120	+ 120	-	-	+ 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.) Candida albicans	+ 150	-	-	+ 120	+ 120	+ 150	-	-	+ 120	+ 120	-	-	+ 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.) Candida tropicalis	+ 40	+ 150	+	+ 40	+ 90	+ 40	-	-	+ 120	+ 120	-	+	+ 180	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
15.) Candida albicans	+	-	-	+ 120	+ 120	+ 180	-	-	+ 120	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.) Candida albicans	+	-	-	+ 150	+ 150	+ 180	-	-	+ 150	+ 150	-	-	+ 180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.) Candida albicans	+	-	-	+ 150	+ 150	+ 180	-	-	+ 150	+ 150	-	-	+ 180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.) Candida albicans	+	-	-	+ 150	+ 150	+ 180	-	-	+ 150	+ 150	-	-	+ 180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.) Candida albicans	+	-	-	+ 180	+ 180	+ 180	-	-	+ 180	+ 180	-	-	+ 180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20.) Candida tropicalis	+ 150	+ 150	+ 180	+ 90	+ 90	+ 150	-	-	+ 90	+ 90	+ 150	+ 300	+ 150	+ 150	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
21.) Candida tropicalis	+ 150	-	+ 150	+ 180	+ 90	+ 150	-	-	+ 90	+ 90	+ 150	+ 300	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
22.) Candida tropicalis	+ 150	-	+	+ 30	+ 30	+ 150	-	-	+ 30	+ 30	-	-	+ 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23.) Candida pseudotropicalis	+ 40	+ 150	+	+ 40	+ 90	+ 40	+ 150	+ 210	-	-	+ 40	+	-	+ 150	-	-	-	-	-	+	-	+	+ 260	-	-
24.) Candida pseudotropicalis	+ 40	+ 150	+	+ 40	+ 180	+ 40	+ 150	+ 180	-	-	+ 40	+ 120	-	+ 150	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
25.) Candida pseudotropicalis	+ 240	+ 240	+	+ 180	+ 180	+ 240	+ 180	+ 180	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+ 240	-	-
26.) Candida pseudotropicalis	+ 90	+ 210	+	+ 90	+ 180	+ 90	+ 180	+ 180	-	-	+ 90	+	-	+ 90	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
27.) Candida pseudotropicalis	+ 90	+ 90	+	+ 90	+ 180	+ 90	+ 90	+ 180	-	-	+ 90	+ 120	-	+ 90	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
28.) Candida pseudotropicalis	+ 240	+ 240	+	+ 240	+ 240	+ 240	+ 240	+ 240	-	-	+ 240	+ 240	-	+ 240	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
29.) Candida pseudotropicalis	+ 240	+ 240	+	+ 240	+	+ 240	+ 240	+ 240	-	-	+ 240	+	-	+ 240	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
30.) Candida pulcherrima	+ 90	-	-	+ 90	+ 180	+ 90	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31.) Candida pulcherrima	+ 90	-	-	+ 90	+ 120	+ 90	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32.) Candida pulcherrima	+ 90	-	-	+ 90	+ 120	+ 90	-	-	+ 40	+ 120	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.) Candida pulcherrima	+ 150	-	-	+ 150	+ 180	+ 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34.) Candida robusta	+ 90	-	-	+ 90	+ 90	+ 90	-	-	+ 40	+ 60	+ 40	+ 60	-	+ 90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35.) Candida stellatoidea	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
36.) Candida utilis	+	-	-	+ 180	+ 180	+ 180	-	-	+ 180	+ 180	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37.) Candida parapsilosis	+	-	-	+ 180	-	+ 180	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38.) Candida reukauffii	+ 240	-	-	+ 240	-	+ 240	-	-	-	-	+ 240	-	-	+ 240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39.) Candida guilliermondii	+ 240	+ 240	-	+ 240	-	+ 240	-	-	-	-	+ 240	+	-	+ 240	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
40.) Candida krusei	+ 90	-	-	+ 90	+ 180	+ 90	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41.) Candida humicula synonyma curvata	+ 150	-	-	+ 150	-	+ 150	-	-	+ 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42.) Cryptococcus neoformans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
43.) Rhodotorula mucilaginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
44.) Saccharomyces cerevisiae	+ 240	-	-	+ 60	+ 60	+ 180	-	-	+ 60	+ 60	+ 60	+ 60	-	+ 180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45.) Saccharomyces rouxii	+ 150	-	-	+ 150	+ 240	+ 150	-	-	+ 150	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46.) Torulopsis Dattila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47.) Torulopsis famata	+ 150	-	-	+ 150	-	+ 150	-	-	+ 150	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
48.) Torulopsis glabrata	+ 240	-	-	+ 120	+ 120	+ 150	-	-	-	-	-	-	+ 240	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49.) Trichosporon cutaneum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Erläuterungen:

Bei den Kohlenhydraten und den Glycosiden Aesculin und Salicin wurde die Säurebildung, bei Na-formiat die Alkalisierung registriert. Zur Beurteilung der enzymatischen Substratspaltung in allen anderen Gruppen dienten spezielle Nachweise der Spaltprodukte

Zeichenerklärung:

+ = positiver Reaktionsausfall
- = negativer Reaktionsausfall
(+) = unklarer Befund
Zahlen = Inkubationsdauer in Minuten. In allen anderen Fällen betrug die Inkubationszeit 6 Stunden.

	Substrate der Esterasen und Lipasen						Substrate der saure Phosphatasen				Substrate der alkalische Phosphatasen				Substrate der Peptidasen		
	Laurinsäure-β-Naphthylester	Indoxylacetat (pH 8,5)	Indoxylbutyrat (pH 8,5)	Capryl(Laurin-)-Naphthol (pH 9,4)	1-Naphthyl-1-Phenyl (pH 7,4)	p-Nitrophenyl-Palmitat (pH 7,4)	α-Naphthyl-Phosphat (pH 5,2)	β-Glycerin-Phosphat (pH 7,6)	Phenolphthalin-diphosphat (pH 5,4)	1-Naphthyl-phosphat (pH 8,3)	p-Nitrophenyl-Phosphat (pH 10,5)	di-Naphthol-phosphat (pH 9,3)	Phenolphthalin-diphosphat (pH 9,7)	L-Cystin-di-β-Naphthylamid (pH 8,0)	L-Leucin-(α-naphthyl)-Amid (pH 8,6)	L-Tyrosin-(β-naphthyl)-Amid (pH 7,05)
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
1.) Candida albicans Holland	–	+ 60	+ 60	+	+ 90	+	+	+	+	+	+ 180	–	–	+	–	+
2.) Candida albicans London A	–	+ 60	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	(+)	–	+
3.) Candida albicans London B	–	+ 60	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	(+)	–	(+)	–	+
4.) Candida albicans	–	+ 180	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	(+)	+	–	–	+	–	+
5.) Candida albicans	–	+ 180	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
6.) Candida albicans	–	+ 180	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
7.) Candida albicans	–	+ 180	+ 180	+	+	+	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	–
8.) Candida albicans	–	+ 180	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	+	+	–	+
9.) Candida albicans	–	+ 180	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	–	–	–
10.) Candida albicans	–	–	–	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	–	–	–
11.) Candida albicans	–	+	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
12.) Candida albicans	–	+	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
13.) Candida albicans	–	+	+ 180	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
14.) Candida tropicalis	–	+ 60	+ 60	+	+ 90	+	+ 240	+	+	+	+ 40	+	–	+	–	+
15.) Candida albicans	–	+ 30	+ 30	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	+	–	+
16.) Candida albicans	–	+ 60	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
17.) Candida albicans	–	+ 30	+ 30	+	+	+	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
18.) Candida albicans	–	+ 60	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	+	–	+
19.) Candida albicans	–	+ 30	+ 30	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
20.) Candida tropicalis	–	+ 120	+ 120	+	+	+	+ 240	+	+	+	+ 150	+	–	+	–	+
21.) Candida tropicalis	–	+ 120	+ 120	+	+	+	+ 240	+	+	+	+ 150	+	–	+	–	+
22.) Candida tropicalis	–	+ 120	+ 120	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
23.) Candida pseudotropicalis	–	+ 60	+ 60	+	+ 90	–	+ 240	+	+	+	+	+	+	+	–	–
24.) Candida pseudotropicalis	–	+ 60	+ 120	+	+ 30	–	+ 240	+	+	+	+ 40	+	–	+	–	–
25.) Candida pseudotropicalis	–	+ 60	+ 120	+	+ 30	–	+ 240	+	+	+	+ 180	+	–	+	–	–
26.) Candida pseudotropicalis	–	+ 30	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	+	–	–
27.) Candida pseudotropicalis	–	+ 30	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	+	–	–
28.) Candida pseudotropicalis	–	+ 180	+ 180	+	+ 180	(+)	+ 240	+	+	+	+ 120	+	–	+	–	–
29.) Candida pseudotropicalis	–	+ 180	+ 180	+	+ 180	(+)	+ 240	+	+	+	+	+	–	+	–	–
30.) Candida pulcherrima	–	+ 30	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
31.) Candida pulcherrima	–	+ 30	+ 60	+	+	+	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
32.) Candida pulcherrima	–	+ 30	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	(+)	–	+
33.) Candida pulcherrima	–	+ 180	+ 180	+	+	+	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	+
34.) Candida robusta	–	+ 30	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	+	–	–
35.) Candida stellatoidea	+	–	–	+	+	+	+ 240	+	+	+	+	+	+	–	–	+
36.) Candida utilis	–	+ 30	+ 30	+	+ 150	+	+ 240	+	+	+	+ 150	+	+ 180	+	–	–
37.) Candida parapsilosis	–	+ 30	+ 30	+	+ 150	+	+ 240	+	+	+	+ 150	+	+ 180	–	–	–
38.) Candida reukauffii	–	(+) 180	(+) 180	+	+ 180	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	+	–	–
39.) Candida guilliermondii	–	+ 180	+ 180	+	+ 180	(+)	+ 240	+	+	+ 240	+ 120	+	–	(+)	–	–
40.) Candida krusei	–	+ 30	+ 60	+	+	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	+	–	+
41.) Candida humicula synonyma curvata	–	+ 180	+ 180	–	+	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	–	–	–
42.) Cryptococcus neoformans	–	–	–	–	+	–	+ 240	+	+	+	–	–	–	+	–	–
43.) Rhodotorula mucilaginosa	–	(+) 180	(+) 180	–	+	–	+ 240	–	+	+	+	+	–	+	–	+
44.) Saccharomyces cerevisiae	–	+ 180	+ 180	+	–	–	+ 240	+	+	+ 240	+ 120	+	(+)	+	–	+
45.) Saccharomyces rouxii	–	+ 180	+ 180	+	+	–	+ 240	–	+	+	+	(+)	–	–	–	–
46.) Torulopsis Dattila	–	–	–	+	+ 180	–	+ 240	+	+	+	+	–	–	–	–	–
47.) Torulopsis famata	–	+ 180	+ 180	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–
48.) Torulopsis glabrata	–	+ 180	+ 180	+	+ 180	(+)	+ 240	+	+	+	+	(+)	–	–	–	+
49.) Trichosporon cutaneum	–	–	–	–	+	–	+ 240	+	+	+	+	+	–	–	+	–

1. Candida albicans Nr. 2,3,4,5,6,8,15
2. Candida albicans Nr. 11,12,13,18
3. Candida albicans Nr. 16,17,19
4. Candida pseudotropicalis Nr. 23,24,25,26
5. Candida pseudotropicalis Nr. 28,29

Die den Stämmen einer Art gemeinsamen biochemischen Lei= stungen sind in Tab.4 zusammengefaßt. Im Gegensatz zu Candida albicans spaltet Candida tropicalis immer N-Carbo-ß-naphthoxy-D,L-phenylalanin. Diese Reaktion kann jedoch zur Abgrenzung nicht herangezogen werden, da sie bei Candida albicans wechselnd positiv oder negativ ausfällt. Umgekehrt ist der bei Candida albicans stets negative Reaktionsausfall bei Untersuchung der Gasbildung aus D(+)Galactose, Saccharose und Raffinose deshalb nicht zur Differenzierung zu verwerten, weil diese Tests bei Candida tropicalis nicht immer positiv ausfallen. Gleiches gilt für die Salicinspaltung und die Spaltung von Dinatriumphenyl= phosphat. Somit lassen sich Candida albicans und Candida tropi- calis nur dadurch voneinander abgrenzen, daß man an Hand meh= rerer Reaktionen die höhere Stoffwechselaktivität von Candida tropicalis nachweist.

So findet man beispielsweise zwischen Candida albicans Nr.1 und Candida tropicalis Nr.14 Abweichungen in folgenden 5 Kriterien: Candida tropicalis bildet zum Unterschied zu Candida albicans Säure und Gas aus Galactose und Saccharose, Säure aus Trehalose und spaltet Salicin und Di-Na-phenylphosphat pH 9,3.

Aus Tab.4 ist ersichtlich, daß sich Candida pseudotropi- calis gegenüber Candida albicans und Candida tropicalis durch die Fähigkeit auszeichnet, Gas aus Galactose, Lactose und Säure

Tab. 4	Candida albicans	Candida tropicalis	Candida pseudotropicalis	Candida pulcherrima	Saccharomyces	Torulopsis
D(+)Galactose (Gas-Bildung)	-	o	+	-	-	-
D(+)Lactose (Gas-Bildung)	-	-	+	-	-	-
Maltose (Gas-Bildung)	+	+	-	o	+	-
Maltose (Säurebildung)	+	+	-	o	+	o
Saccharose (Gas-Bildung)	-	o	+	-	+	-
Raffinose (Säurebildung)	-	o	+	-	o	-
Salicin (Säurebildung)	-	o	+	-	-	o
6-Brom-2-naphthyl-ß-D-galacto=pyranosid	-	-	+	-	-	-
Na-formiat (Alkalisierung)	o	-	-	o	-	-
di-Na-phenyl-phosphat	-	o	+	-	o	-
L-Cystin-di-ß-naphthylamid	o	o	+	+	-	o
N-Carbo-ß-naphth-oxy-D,L-phenyl-alanin	o	+	-	+	o	o

Zeichenerklärung: + = Positiver Reaktionsausfall bei allen Vertretern seiner Art
- = Negativer " " " "
o = bei den Vertretern einer Art kamem positive u.negative Reaktionsausfälle vor

aus Raffinose zu bilden. Außerdem werden Salicin, 6-Brom-2-naphthyl-ß-D-galactopyranosid, di-Na-phenylphosphat und L-Cystin-di-ß-naphthylamid gespalten. Demgegenüber spaltet Candida pulcherrima nur L-Cystin-di-ß-naphthylamid und N-Carbo-ß-naphthoxy-D,L-phenylalanin. Saccharomyces fermentiert nur Maltose und Saccharose. Bei Torulopsis sind keine der hier aufgeführten Kriterien konstant positiv, jedoch eine Reihe von Reaktionen in charakteristischer Weise stets negativ.

II. Vergleich der biochemischen Reaktionen zwischen proliferierenden und ruhenden Kulturen

Die bei unseren Versuchen mit nichtproliferierenden Hefesuspensionen erzielten Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Resultaten überein, die bisher an proliferierenden Zellkulturen gewonnen wurden[35,36,37,24]. Zum Vergleich können nicht alle von uns durchgeführten Reaktionen herangezogen werden, sondern nur diejenigen, die zur Differenzierung in der klassischen mykologischen Diagnostik gebräuchlich sind, nämlich die Reaktionen zur Prüfung der Fermentation und Assimilation von Kohlenhydraten. Weitere vergleichbare Reaktionen sind die NH_3-Bildung aus Harnstoff und die Nitratreduktion.

In einigen Fällen sind Abweichungen bei sehr langsam verlaufenden Reaktionen zu beobachten, wie z.B. bei der zu erwartenden Gasbildung[31] aus Saccharose durch Candida tropicalis (Nr.22, Tab.3). Diese Hefeart zeigte auch nach 20stündiger Reaktionszeit weder Säure- noch Gasbildung, die üblicherweise (z.B. Tab.3 Nr.14,20,21) im Laufe von 6 Stunden eintreten. Auch die Gasbildung aus Galactose war bei allen untersuchten Stämmen

von Candida tropicalis entsprechend verzögert. Nur ein einzi= ger Vertreter (Tab.3, Nr.22) zeigte im Laufe von 3 Stunden Gasbildung.

Die von BÜRGER[14] angegebene Inkubationszeit von maximal 6 Stunden erwies sich im übrigen als ausreichend. Eine Verlän= gerung bei negativen Reaktionsausfällen um maximal 3 Stunden führte, abgesehen von den oben genannten Beispielen, in keinem Fall nachträglich zu einem positiven Ergebnis. Vielmehr waren die meisten Reaktionen schon in wesentlich kürzerer Zeit abge= laufen (Tab.3), was besonders leicht beobachtet werden konnte, wenn die Substratspaltung durch Farbänderung angezeigt wurde.

Es fällt auf, daß bei den Glycosiden Aesculin und Salicin in einigen Fällen eine Spaltung ohne nachweisbare Säurebildung stattfand. Dies trifft zu für Candida pseudotropicalis (Tab.3, Nr.27,28,29) und für 3 Vertreter von Candida tropicalis (Tab.3, Nr.14,20,21). Da diese Hefen Glucose abbauen, könnte hierfür die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Nachweise ver= antwortlich sein. So lassen sich einerseits wenige µg des Algu= cons nachweisen, während andererseits zum Säurenachweis durch Indikatorumschlag die Überwindung der Pufferkapazität erforder= lich ist.

Bei der Spaltung eines Zuckers können die einzelnen Hefen offensichtlich verschiedenartige Reaktionswege einschlagen und zu unterschiedlichen Spaltprodukten führen. Diese Möglichkeit ließ sich in einfacher Weise durch Rücktitration des Reaktions= ansatzes auf den Ausgangs-pH-Wert mit n/100 NaOH nachweisen. Wir fanden Pilze mit starker oder schwacher Säurebildung und schließlich auch solche, bei denen im Reaktionsansatz nach

der Inkubation Puffersubstanzen nachweisbar waren.

Obwohl Substrate und Testkeime nicht unter streng sterilen Bedingungen inkubiert werden konnten, blieben im allgemeinen sekundäre bakterielle Verunreinigungen aus. Vereinzelt in Reaktionsansätzen nachweisbare Luftkeime beeinflußten das Ergebnis nicht, weil ihre Menge offensichtlich zu gering war. In substratfreien Kontrollansätzen traten nach entsprechender Inkubation weder Spaltprodukte noch pH-Änderungen auf.

III. Das Verhalten der Pilze gegenüber Substraten der Phosphatasen, Esterasen und Peptidasen

Die hier nachgewiesenen biochemischen Leistungen von Pilzen in der Ruhephase sind an proliferierenden Kulturen nicht untersucht worden, so daß vergleichende Betrachtungen entfallen.

Gegenüber den Substraten der Phosphatasen, Esterasen und Peptidasen verhielten sich die einzelnen Stämme unterschiedlich (Tab.3). Zur Unterscheidung der einzelnen Arten sind jedoch nur die in Tab.4 aufgeführten Substrate 6-Brom-2-naphthyl-ß-D-galactopyranosid, di-Na-phenylphosphat, L-Cystin-di-ß-naphthylamid und N-Carbo-ß-naphthoxy-D,L-phenylalanin brauchbar.

Indoxylacetat und Indoxylbutyrat erwiesen sich als instabil, so daß die Inkubationszeit auf 3 Stunden begrenzt werden mußte. Die Substrate der Phosphatasen und Esterasen werden nach 3-4 Stunden gespalten, wie die Zugabe der Nachweisreagenzien ergab. Demgegenüber benötigte der Nachweis von Peptidasen etwa 5-6 Stunden.

D. Diskussion

Nachfolgend soll die Frage beantwortet werden, inwieweit die geschilderten Reaktionen zur Differenzierung von Pilzen geeignet sind.

Wir sind uns darüber im klaren, daß die Zahl der von uns untersuchten Hefestämme nicht ausreicht, um verbindliche Aus= sagen darüber zu machen, ob sich eine Einteilung bzw. Differen= zierung der Pilze allein durch biochemische Reaktionen erzie= len läßt. Aus den vorliegenden Untersuchungen läßt sich einer= seits entnehmen, welche Reaktionen für eine Gruppenanalyse in Frage kommen und an einem ausgedehnteren Untersuchungsmaterial geprüft werden sollten, andererseits zeigen sie, welche Reaktio= nen mit Sicherheit für eine Gruppendifferenzierung unbrauchbar sind.

Soweit sich unsere Befunde bei nichtproliferierenden Zel= len mit den bisher vorzugsweise auf proliferierende Kulturen beschränkten biochemischen Unterscheidungsmerkmale vergleichen lassen, kann man sagen, daß bis auf einige wenige Abweichungen weitgehende Übereinstimmung besteht.

Bei diesen Differenzen handelt es sich nicht um grundsätz= liche Unterschiede, sondern um sehr langsam ablaufende Reaktio= nen. Für diese Abweichungen, die bei der Gasbildung aus Zuckern beobachtet wurden, scheinen keine methodischen Fehler verant= wortlich zu sein. Der Unterschied zur herkömmlichen Methode liegt vielleicht darin, daß bei dem BÜRGER'schen Verfahren keine Möglichkeit zur Selektion gegeben ist.

Es muß an dieser Stelle besonders betont werden, daß das Untersuchungsergebnis bei einer enzymatischen Keimanalyse weit=

gehend von den gewählten Versuchsbedingungen abhängt. Das Resultat wird beeinflußt durch den pH-Wert, die Inkubationszeit und -temperatur, Substratkonfigurationen, Permeabilitätsverhältnisse, Enzymlokalisation[33], sowie von der Anwesenheit von Enzymhemmern. Die oben erwähnten Ergebnisse sind also nur unter den beschriebenen Versuchsbedingungen diagnostisch verwertbar. Bei der von uns gewählten Anordnung wurde nicht berücksichtigt, ob ein Enzym als Exo- oder Endo-enzym vorliegt. Erfaßt werden neben konstitutiven Enzymen auch induktive Enzyme, da die Inkubationsdauer für eine Enzyminduktion als ausreichend angesehen werden muß[34].

Biochemische Unterschiede zwischen proliferierenden und nichtproliferierenden Kulturen könnten auch auf wachstumsphasenabhängige Enzyme und die veränderten äußeren Bedingungen zurückzuführen sein[38,39]. Außerdem ist bei proliferierenden Kulturen mit milieu- bzw. substratbedingten selektiv wirkenden Faktoren zu rechnen, welche die Vermehrung einer in der Population in der Minderzahl vorkommenden Mutante begünstigt, so daß unter entsprechenden Versuchsbedingungen nicht die Enzymausstattung der primär vorliegenden Art, sondern diejenige der selektiv begünstigten Mutante erfaßt wird.

Inwieweit die hier geschilderten, neuen biochemischen Reaktionen zur Differenzierung brauchbar sind, kann letzten Endes nur an einem ausgedehnteren Untersuchungsmaterial festgestellt werden. Es läßt sich aber jetzt schon sagen, daß das klassische Verfahren durch die neuen Reaktionen nutzbringend ergänzt wird, da sich die mit ihnen erhobenen Befunde nicht regellos auf die untersuchten Arten verteilen. Dadurch, daß

die Zahl der biochemischen Merkmale erhöht wird, kann die Dif= ferenzierung in denjenigen Fällen erleichtert werden, in denen Mutanten zur Fehldeutung Anlaß geben. Verändert nämlich eine Mutation eine der wenigen in der mykologischen Routine-Diagno= stik bisher üblichen Kriterien, so wird eine richtige Diagnose unwahrscheinlich.

Das Arbeiten mit nichtproliferierenden Keimsuspensionen in definierten Mineralmedien bietet einige Vorteile. Dadurch, daß einer Pufferlösung nur ein einziges Substrat zugesetzt wird und jeweils eines der beim Abbau des Substrates auftretenden Spaltprodukte mit einer spezifischen Reaktion nachgewiesen wird, erhält man reproduzierbare und übersichtliche Reaktionsbedingun= gen. Das Mineralmedium, welches nur zur Aufrechterhaltung des pH-Optimum dient, ist wegen Mangel an Nährstoffen zur Prolife= ration der Keime extrem ungünstig. Deswegen sind bei der kurzen Reaktionszeit von maximal 6 Stunden keine streng sterilen Ar= beitsbedingungen erforderlich. Eine Beeinflussung des Reaktions= ablaufes durch Fremdkeime ist also nicht zu erwarten. Die Ver= suchsdauer kann auf 6 Stunden beschränkt werden, weil bei die= ser Methode die Anzucht der Keime unabhängig von der Prüfung ihrer biochemischen Leistung erfolgt, bereits vorhandene Enzyme ohnehin in diesem Zeitraum genügend wirksam werden, und die Zeit zur Induktion ausreicht.

Die Vorteile des Verfahrens machen sich nicht nur bei dem Nachweis von Esterasen, Peptidasen, Phosphatasen, Sulfatasen und Glycosidasen, bei welchem spezifische Spaltprodukte nach= gewiesen werden, sondern auch bei der Beurteilung des Abbaus von Kohlenhydraten, Alkoholen und Säuren bemerkbar, weil auch

diese Substrate schneller unter reproduzierbaren Bedingungen reagieren.

Unbefriedigend ist, daß bei den zuletzt genannten Reaktio= nen keine spezifischen Spaltprodukte nachgewiesen werden. Die Nachweisreaktion beruht nur auf einer pH-Änderung, die durch einen geeigneten Indikator angezeigt wird. Die alleinige Fest= stellung einer pH-Verschiebung beim Abbau dieser Substanzen ist mehrdeutig, da hierbei nichts über den Reaktionsweg ausge= sagt wird, auf dem sie zustande kommt. Aus einer pH-Änderung ist nicht ersichtlich, welche Enzyme bei mehreren Möglichkeiten im gegebenen Fall am Substratabbau beteiligt waren.

Wie unempfindlich außerdem derartige Reaktionen sind, geht aus den Beispielen der Aesculin- und Salicinspaltung hervor. Für die Glycosidspaltung gibt es neben dem Indikatornachweis noch spezifische Nachweise für das Aglukon, die 1-2 Zehnerpo= tenzen empfindlicher sind. So ließ sich z.B. bei der untersuch= ten Candida pseudotropicalis eine Substratspaltung nachweisen (Tab.3), obwohl eine Säurebildung nicht beobachtet werden konn= te.

Nicht nur die geringe Empfindlichkeit der pH-Verschiebung kann zu Fehldeutungen führen, sondern auch das Auftreten puf= fernder Substanzen, die einem pH-Umschlag entgegenwirken, ob= wohl saure Spaltprodukte auftreten. Diese geringe Empfindlich= keit läßt sich durch Erniedrigung der Pufferkapazität des Mine= ralmediums deshalb nicht ausgleichen, weil man sonst in einen Bereich käme, der größenordnungsmäßig in der Nähe der Puffer= wirkung der Keimsuspension selbst läge.

Ein weiterer Nachteil beim Arbeiten mit Indikatoren besteht

darin, daß durch Abbau und Entfärbung oder durch Ausfällung des Indikators eine Säurebildung vorgetäuscht werden kann. Erst nach Zusatz von frischem Indikator ist in solchen Fällen zu erkennen, ob ein Substratabbau stattgefunden hat.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei dem Versuch der enzymatischen Differenzierung auf Grund der Alkylamidasen, wie sie zuerst von BÖNICKE[40] bei der Typenbestimmung von Tuber= kelbakterien und später von MUFTIC[29] bei der Pilzdiagnostik verwendet wurde. Da bei dieser Reaktion NH_3 als Spaltprodukt nachgewiesen wird, ist der Versuchsablauf sehr störanfällig, weil Spuren von NH_3, die durch die hochempfindliche Nachweis= reaktion erfaßt werden, einerseits in substratfreien Keimlösun= gen nach entsprechender Inkubation nachweisbar waren. Auf die= se nicht reproduzierbare und ebenfalls unspezifische Nachweis= reaktion wurde verzichtet.

Die Vorteile des Verfahrens (geringer Zeitaufwand, Nach= weis spezifischer Spaltprodukte, reproduzierbare Bedingungen, Möglichkeit zur Prüfung einer größeren Zahl biochemischer Lei= stungen) überwiegen die Nachteile, die darin bestehen, daß langsam ablaufende Adaptationsvorgänge nicht beobachtet werden können. Es ist zu erwarten, daß die mykologische Diagnostik durch das Arbeiten mit ruhenden Keimsuspensionen vereinfacht und ergänzt werden kann. Eine wichtige Voraussetzung hierfür wäre allerdings, daß man die Reaktionen nicht auf umständliche Weise in Röhrchen ausführt, sondern die dafür vorgesehene, oben beschriebene Vorrichtung[13] benutzt. - Da das Kammersystem mit automatischem Füllgerät noch nicht von der Industrie geliefert wird, stand bisher nur eine Modellvorrichtung zur Verfügung, mit der nur die Gasentwicklung beobachtet werden konnte.

E. Zusammenfassung

Es wurden die biochemischen Leistungen von 49 nichtproli= ferierenden Stämmen aus 20 Pilzarten mit der Mikromethode nach BÜRGER[13] an 67 verschiedenen Substraten geprüft. Die Reaktio= nen betrafen die Säure- und Gasbildung aus Zuckern, die Säure= bildung aus Alkoholen, den Abbau von Glycosiden, organischen Säuren und Aminosäuren, ferner die Nitratreduktion, die NH_3-Bildung aus Harnstoff und die H_2S-Bildung aus Cystein. Für diese in der Ruhephase der Keime geprüften Substratspaltungen liegen vergleichbare Beobachtungen an proliferierenden Pilzkulturen aus der klassischen mykologischen Diagnostik vor.

Darüber hinaus wurden erstmals die biochemischen Leistun= gen der Pilze auch an Substraten der Phosphatasen, Esterasen, Sulfatasen und Peptidasen untersucht.

Insgesamt wurden hierbei 16 500 Einzelversuche durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die biochemischen Unterschei= dungsmerkmale, die sich bisher fast ausschließlich auf prolife= rierende Kulturen bezogen, auch für nichtproliferierende Keime Geltung haben. Das Arbeiten mit ruhenden Pilzsuspensionen bie= tet jedoch erhebliche Vorteile. Sie bestehen in einem wesent= lich schnelleren Reaktionsablauf, sowie stets reproduzierbaren und übersichtlichen Reaktionsbedingungen. Bei der kurzen Reak= tionszeit sind streng sterile Arbeitsbedingungen nicht erfor= derlich, was eine erhebliche Erleichterung bedeutet.

Falls zur Differenzierung zweier Arten keine spezifischen Reaktionen existieren, ist dennoch eine Abgrenzung durch Be= rücksichtigung einer größeren Zahl biochemischer Leistungen möglich, wie an dem Beispiel von Candida albicans und Candida

tropicalis gezeigt wurde. Hierbei erwies sich Candida tropicalis als wesentlich stoffwechselaktiver.

Das BÜRGER'sche Kammersystem erlaubt die Prüfung einer weit größeren Zahl biochemischer Leistungen als die klassischen Verfahren im Reagenzglas. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, eine erregerspezifische Diagnose zu stellen, erheblich erhöht. Außerdem können Mutanten leichter erfaßt werden. Ein Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß sich Adaptationsvorgänge, die eine Versuchsdauer von 2-3 Wochen benötigen, beim Arbeiten mit nichtproliferierenden Keimen nicht beobachten lassen.

F. Literaturverzeichnis

1.) BÜRGER,H. und MÜLLER,H.L.:
Untersuchung zur Schnelldiagnostik von Hefen.
5. Wissenschaftliche Tagung der deutschsprachigen Mykolo= gen, München 17.-18.Juli (1965) im Druck

2.) SOTO,O.B.:
Fermentation reactions with dried paper discs containing carbohydrate and indicator.
Puerto Rico J.Publ.Health 25 (1949) 96-106

3.) HENRIKSEN,S.D.:
A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of proteus from other enteric organisms.
J.Bact. 60 (1950) 225-231

4.) COWAN,S.T.:
Fermentation: Biochemical micromethods for bacteriology.
J.Gen.Microbiol. 8 (1953) 391-396

5.) SNYDER,M.L.:
Paper discs containing enteric culture medium for the differentiation of bacteria.
J.Path.Bact. 67 (1954) 217-226

6.) PICKETT,M.J., SCOTT,M.L. and HOYT,R.E.:
Tabletted medium for biochemical tests in diagnostic bacteriology.
Amer.J.Med.Techn. 21 (1955) 170-174

7.) HOYT,R.E. and PICKETT,M.J.:
Use of "rapid substrate" tablets in the recognition of enteric bacteria.
Amer.J.Clin.Path. 27 (1957) 343-353

8.) SANDERS,A.C., FABER,J.E.jr. and COOK,T.M.:
A rapid method for the characterisation of enteric bacteria using paper discs.
Appl.Microbiol. 7 (1957) 36-40

9.) COOK,T.M. and PELCZAR,M.J.jr.:
Detection of hydrogen sulfide production by bacteria using paper discs methods.
Appl.Microbiol. 6 (1958) 193-197

10.) BERGQUIST,L.M. and SEARCY,R.L.:
A new micro fermentation technique for rapid detection of acid and gas.
Amer.J.Med.Techn. 28 (1962) 337-338

11.) EGLER,L. und TOTH,M.:
Biochemische Micromethode zur Gruppenidentifizierung von Darmbakterien.
Zbl.Bakt. I (Orig.) 189 (1963) 294-297

12.) BÜLOW,W.:
The ONPG-test in diagnostic bacteriology. 2.Comparison of the ONPG-test and the conventional lactose-fermentation test.
Acta Path.Microbiol.Scand. 60 (1964) 387-402

13.) BÜRGER,H.:
Ein Verfahren zur Prüfung zahlreicher biochemischer Lei= stungen nichtproliferierender Bakterien, dargestellt am Beispiel der Enterobacteriazeen.
Zbl.Bakt. (I. Orig.) 196 (1965) 469-476

14.) BÜRGER,H.:
Biochemische Leistungen nichtproliferierender Mikroorga= nismen. II. Nachweis von Glycosid-Hydrolasen, Phosphata= sen, Esterasen und Lipasen.
Zbl.Bakt. I. Orig. 1966 (im Druck)

15.) BÜRGER,H.:
Biochemische Leistungen nichtproliferierender Mikroorga= nismen. III. Nachweis von Sulfatasen und Peptidasen.
Zbl.Bakt. I. Orig. 1966 (im Druck)

16.) TARSHIS,M.S.:
A rapid 24-hour micro-phenolphthalein sulfatase test for distinguishing M.avium from the unclassified Battey Ba- cilli.
Acta Tuberc.Scand. 45 (1964) 221-229

17.) MANNHEIM,W. und BÜRGER,H.:
Über die physiologischen Merkmale und die Frage der systematischen Stellung des Rotz-Erregers.
Z.Med.Microbiol.Immunol. 152 (1966) 249-261

18.) SHIFRINE,M.PHAFF,H.J. and DEMAIN,A.L.:
Determination of carbon assimilation patterns of yeasts by replica plating.
J.Bact. 68 (1954) 28-35

19.) THJOTTA,T. and TORHEIM,B.J.:
Studies of the fermentation of sugars in the candida-group.
Acta Path.Microbiol.Scand. 36 (1955) 237-249

20.)NEWTON,A., SHAW,E.D., GOODE,C.S. and RIGGAL,F.O.:
Identification of C.albicans.
J.Invest.Derm. 35 (1960) 123

21.) NOVÁK,E.K.:
A rapid method for the investigation of raffinose fermentation by yeasts.
Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung. 7 (1960) 225-230

22.) MARCELOU-KINTI,U. et VOURNOUS,M.:
Méthode simple pour l'étude du pouvoir fermentatif des candida.
Arch.Inst.Pasteur Hellen. 7 (1961) 163-166

23.) DOMNAS,A.:
Amide metabolism in yeasts. II. The uptake of amide like compounds by yeast.
J.Biochem. 52 (1962) 149-154

24.) FRIEDRICH,E.:
Die Sproßpilze des Menschen.
Beitr.Hyg.Epidem. 16 (1962) 1-63

25.) HAYES,A. and THOMPSON,J.R.:
Identification of Candida albicans.
Techn.Bull.Regist.Med.Tech. 33 (1963) 177-179

26.) KAMINSKY,D. and QUINLAN,L.:
A simple inexpensive method for rapid identification of Candida albicans.
Amer.J.Clin.Path. 40 (1963) 143-145

27.) JUMINER,B.:
Isolement et identification des candida.
Arch.Inst.Pasteur Tunis 40 (1963) 83-90

28.) MUFTIC,M.K.:
Study of amide metabolism in candida.
Path.Microbiol. 26 (1963) 250-253

29.) MUFTIC,M.K.:
Die Klassifizierung der verschiedenen Arten der Gattung Candida mit der Amid-Reihe nach Bönicke.
Hefepilze als Krankheitserreger bei Mensch und Tier.
Springer Verlag Berlin,Göttingen,Heidelberg (1963) S.9-11

30.) ZSOLT,J., PERKI,M. and NOVÁK,E.K.:
Taxonomic studies on Procandida albicans
1. Fermentation of sugars.
Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung. 10 (1963) 141-148

31.) COSTA,S.O.P. and de LOURDES BRANCO:
Evaluation of a molebdenum culture medium as selective and differential for yeasts.
J.Path.Bact. 87 (1965) 428-431

32.) WINKLE,S.:
Mikrobiologische und serologische Diagnostik.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1955) S.278

33.) TONINO,G.J.M. and STEYEN-PARVÉ,E.P.:
Localisation of some phosphatases in yeast.
Biochim.Biophys.Acta 67 (1963) 453-469

34.) SWENSON,P.A. and BETTS,R.F.:
Aerobic fermentation and the depletion of the amino acid pool in yeast cells.
J.Gen.Physiol. 46 (1963) 187-403

35.) LODDER,J. and KREGER-VAN RIJ,N.J.W.:
The yeasts, a taxonomic study.
North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1952

36.) VÖRÖS-FEIKAI,G. and NOVÁK,E.K.:
Raffinose assimilation of yeasts.
Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung. 8 (1961) 333-337

37.) NOVÁK,E.K. and ZSOLT,J.:
Taxonomic studies on Procandida albicans.
2. Disaccharide-splitting enzymes.
Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung. 10 (1963) 149-153

38.) SKINNER,C.E. and FLETCHER,D.W.:
A review of the genus candida.
Bact.Rev. 23 (1960) 397-419

39.) TAYLOR,J.J.:
Demonstration and possible significance of uricase in human pathogenic fungi.
Nature 194 (1962) 403-404

40.) BÖNICKE,R.:
Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mycobakterien.
Zbl.Bact. I. Orig. 179 (1960) 209-223

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung 3

B. Material und Methoden 6
I. Testkeime 6
II. Züchtung 6
III. Durchführung der Versuche 8
IV. Versuchsdauer 9
V. Auswertung der Versuche 10

C. Ergebnisse 17
I. Differenzierung der Arten 17
II. Vergleich der biochemischen Reaktionen zwischen proliferierenden und ruhenden Kulturen 22
III. Das Verhalten der Pilze gegenüber Substraten der Phosphatasen, Esterasen und Peptidasen 24

D. Diskussion 25

E. Zusammenfassung 30

F. Literaturverzeichnis 32

Herrn Professor Dr.med. R.SIEGERT, Direktor des Hygiene-Instituts der Universität Marburg/Lahn, danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die uneingeschränkte Förderung meiner Arbeit.

Ferner bin ich Herrn Dipl.Chemiker Dr.med. H.BÜRGER für seine Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Frau Dr.med. H.-L.MÜLLER für die Überlassung der Pilzstämme und mykologische Beratung zu herzlichem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 10.Oktober 1938 wurde ich, Elisabeth Pöppel, geb. Lauer, als Tochter des Oberstudienrates Dr. F.J.Lauer und seiner Ehefrau, der Stud.Ass. Marie Luise, geb. Loskyll, in Köln geboren. Die Reifeprüfung legte ich am 14.März 1958 an dem Realgymnasium für Mädchen, der Marienschule, in Fulda ab. Im Sommersemester 1958 begann ich das Medizinstudium an der Universität Marburg. Dort bestand ich am 20.April 1959 das Vorphysikum und am 26.April 1961 das Physikum. Die weiteren 6 klinischen Semester verbrachte ich ebenfalls an der hiesigen Universität und bestand im Herbst 1964 das Medizinische Staatsexamen. Von Februar - September 1965 war ich als Medizinal-Assistentin in der Medizinischen Klinik der Universität Marburg und von Oktober 1965 - Juli 1966 an dem Hygiene-Institut der Universität Marburg tätig. Seit August 1966 bin ich an der Universitätsfrauenklinik.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Beckmann, Berendes, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Exner, Förster, Gedigk, Gross, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Lang, Linneweh, Mahr, du Mesnil de Rochemont, Meyer, Müller, Neubauer, Niessing, Petry, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Streicher, Walcher, Würterle.